

2. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова Н. Б. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1976, с. 112.
3. Карпова Т. С., Горденин Д. А., Андрианова В. М., Инге-Вечтомов С. Г. Генетический экспресс-тест для различения гаплоидов и автодиплоидов у дрожжей-сахаромицетов. Генетика, 1983, т. XIX, № 12, 1934—1940.
4. Кашкин П. К., Янушка А. П., Краснопевцева Н. Г., Инге-Вечтомов С. Г. Структурная нестабильность плазмиды, содержащей дрожжевые гены ADE2 и LEU2. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1983, № 10, с. 28—33.
5. Broach J. R. The yeast plasmid 2u circle. — In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. I. Life cycle and inheritance / Eds. J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach. New York, 1981, p. 445—470.
6. Broach J. R. Construction of high copy yeast vectors using 2-um circle sequences. — *Methods in enzymology*, 1983, vol. 101, p. 307—325.
7. Broach J. R., Guarascio V. R., Jayaram M. Recombination within the yeast plasmid 2u circle is site-specific. — *Cell*, 1982, vol. 29, p. 227—234.
8. Broach J. R., Strathern J. N., Hicks J. B. Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. — *Gene*, 1979, vol. 8, p. 121—133.
9. Clarke L., Hsiao C.-L., Carbon J. Selection procedure for isolation of centromere DNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. — *Methods in enzymology*, 1983, vol. 101, p. 300—307.
10. Cohen J. D., Ecclesshall T. R., Needleman R. B. et al. Functional expression in yeast of the *Escherichia coli* plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, p. 1078—1082.
11. Falco S. C., Botstein D. A rapid chromosome-mapping method for cloned fragments of yeast DNA. — *Genetics*, 1983, vol. 105, p. 857—872.
12. Falco S. C., Li Y., Broach J. R., Botstein D. Genetic properties of chromosomally integrated 2u plasmid DNA in yeast. — *Cell*, 1982, vol. 29, p. 573—584.
13. Falco S. C., Rose M., Botstein D. Homologous recombination between episomal plasmids and chromosomes in yeast. — *Genetics*, 1983, vol. 105, p. 843—856.
14. Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. Transformation of yeast. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, p. 1929—1933.
15. Holmberg S., Nilsson-Tillgren T., Kielland-Brandt M. C., Petersen J. G. L. Chromosome breakage in yeast caused by sister-chromatid recombination in an integrated 2-micron plasmid. — *Carlsberg Res. Commun.*, 1982, vol. 47, p. 355—369.
16. Ilgen C., Farabaugh P. J., Hinnen A., Walsh J. M., Fink G. R. Transformation of yeast. — In: *Genetic engineering* / Eds. J. K. Setlow, A. Hollaender. New York, 1979, p. 117—132.
17. Sherman F., Fink G. R., Lawrence C. W. *Methods in yeast genetics*. New York, 1972, p. 55—56.

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ — АНАЛОГОВ мРНК

В. В. АНЦИФЕРОВА, А. Г. ВЕНЬЯМИНОВА,
М. Н. РЕПКОВА, Л. А. ФРАНК, В. И. ЯМКОВОЙ

Синтетические олигорибонуклеотиды в настоящее время широко используются в качестве инструментов исследования для решения целого ряда проблем физико-химической биологии. В частности олигорибонуклеотиды, содержащие иницирующий кодон ArUpG на 5'-конце молекулы, нашли применение в качестве моделей мРНК при изучении функциональной топографии рибосом [1, 15, 16].

В данной работе описан препаративный химико-ферментативный синтез двух аналогов мРНК-нонарибонуклеотида ArUpG(pU)₆ и пентадекарбонуклеотида ArUpG(pU)₆(pA)₅pAr, основанный на использовании T4 РНК-лигазы для «сшивания» химически синтезированных и полученных ферментативным путем коротких олигорибонуклеотидных блоков.*

* Используемые сокращения: ТСХ — тонкослойная хроматография, МКХ — микроколоночная хроматография, MSTetr — мезитилсульфотетразолид, Thr — тетрагидропиридин, MeOTr — метокситригидрил, >CHOE+ — этоксиметилен, ClPh — п-хлорфенил, Trl — 1,2,4-триазол-1-ил, DMAP — 4-диметиламинопиридин, TEAB — триэтил-аммонийбикарбонат.

Материалы и методы. В работе использовали нуклеозиды производства НПО «Биохимреактив», Латв. ССР, поли У и поли А (НИКТИ БАВ, Главмикробиопром СССР), РНКазу T_1 (КФ 3.1.27.3, ICN, США) и РНКазу T_2 (КФ 3.1.27.1, Sankyo Co, Япония, QAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия), Nucleosil C-18 (Macherau Nagel, ФРГ).

Для адсорбционной хроматографии использовали силикагель марки Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), для ТСХ-пластинки DC-AP Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах растворителей: А-хлороформ-метанол (90:10), Б-хлороформ-метанол-триэтиламин (80:19:1).

Хроматографический носитель для обращенно-фазовой хроматографии, представляющий собой политрифторхлорэтиленовый порошок с нанесенным на него тетраоктиламмонийбромидом, получали по методу, описанному в статье В. И. Ямковым и др. [14].

Исходные защищенные нуклеозиды синтезировали стандартными методами.

Нуклеазу из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (КФ 3.1.27) выделяли по методу, описанному С. К. Василенко и В. К. Райт [3] с некоторыми модификациями.

T_4 РНК-лигазу (КФ 6.5.1.3) выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T_4 am 82 [14]. Полученный препарат фермента (концентрация РНК-лигазы 43,4 мкМ, концентрация белка 8,4 мг/мл) содержал не более 1 ед. акт. 3'-экзонуклеазы на 1 пмоль РНК-лигазы [5].

Гомеолигорибонуклеотиды, терминированные 5'-фосфатом и 3'-гидроксидом, получали путем гидролиза соответствующих полирибонуклеотидов нуклеазой из яда кобры [4].

Донор $(pA)_6A^{OH}$ получали периодатным окислением $(pA)_7$ [10] с учетом выявленных нами ранее закономерностей этой реакции [2].

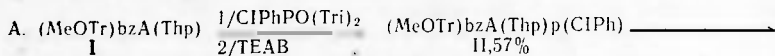
Донор $(pA)_7pA$ получали путем обработки окисленным периодатом натрия $(pA)_7$ анилином при pH 5,0 [10].

Синтез ApUpC. А. К охлажденной суспензии 0,2 г (2,9 ммоль) триазола и 0,15 мл (0,92 ммоль) *n*-хлорфенилфосфодихлорида в 5 мл абс. диоксана при перемешивании добавляли 0,25 мл (1,8 ммоль) абс. триэтиламина в 1 мл абс. диоксана. Смесь нагревали до комнатной температуры, выдерживали 1 ч и полученную суспензию переносили в колбу с раствором 0,5 ммоль 2',5'-О-защищенного нуклеозида (I) в 5 мл абс. пиридина. Через 30—40 мин (контроль — ТСХ, сист. А) реакционную смесь упаривали, растворяли в хлороформе и промывали 0,1 М раствором ТЕАВ, pH 7,5. Водный слой экстрагировали хлороформом (2×3 мл), объединенные органические слои упаривали с добавлением толуола и этанола для удаления пиридина, растворяли в хлороформе и наносили на колонку с силикагелем. Элюцию вели в линейном градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—10%), содержащем 1% триэтиламина.

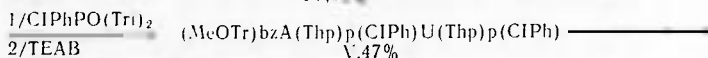
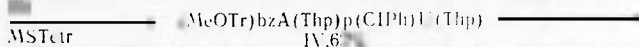
Контроль — ТСХ. Фракции, содержащие диэфир (II), объединяли, упаривали и вещество выделяли осаждением из хлороформсодержащего раствора в смесь абс. петroleйного и серного эфиров (1:1). Выход составил 57%, R_f 0,17 (ТСХ, сист. А) и 0,51 (ТСХ, сист. Б). По аналогичной методике был получен диэфир защищенного динуклеозидфосфата (V), R_f 0,12 (ТСХ, сист. А) и 0,48 (ТСХ, сист. Б), выход — 47%.

0,3 ммоль тщательно высушенного фосфодиэфирного компонента растворяли в 3 мл абс. пиридина, добавляли 0,9 ммоль мезитилсульфотетразолида и 0,4 ммоль 5'-ОН-компонента (III или VI). Через 1 ч (контроль — ТСХ, сист. А) к раствору добавляли равный объем 0,1 М ТЕАВ, pH 7,5. Вещество экстрагировали хлороформом, объединенные

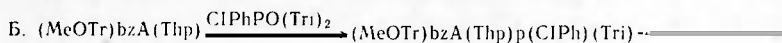
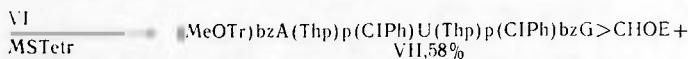
органические слои упаривали с добавлением толуола и этанола, растворяли в хлороформе и хроматографировали на силикагеле, используя линейный градиент концентрации этанола в хлороформе (0—4%). Фракции, содержащие триэфир (IV) или (VII), объединяли, упаривали, и вещество выделяли осаждением из хлороформного раствора в абс. петroleйный эфир. Фосфотриэфир (IV) получен с выходом 62%, R_f 0,54 (ТСХ, сист. А), фосфотриэфир (VII) получен с выходом 58%, R_f 0,42 (ТСХ, сист. А).



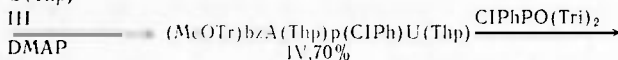
U(Thp)



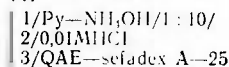
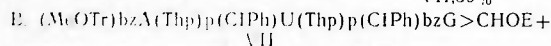
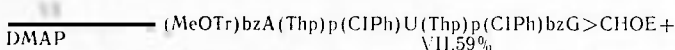
VI



U(Thp)



bzG > CHOЕ +



ArUpG

Б. Синтез проводили, предохраняя реакционные смеси от попадания влаги воздуха. 0,2 М раствор *n*-хлорфенилфосфодитриазолида получали методом, описанным Янковым [13]. К 0,1 ммоль 2',5'-защищенного нуклеозида (I) в 0,6 мл абс. пиридина добавляли 0,6 мл (0,12 ммоль) свежеприготовленного 0,2 М-раствора *n*-хлорфенилфосфодитриазолида (контроль — ТСХ). Через 30 мин к полученному раствору добавляли 0,012 г (0,1 ммоль) 4-диметиламинопиридина, 0,15 ммоль второго защищенного нуклеозида (III) и выдерживали при комнатной температуре 2 ч.

Затем компоненты реакционной смеси разлагали равным объемом 0,1 г TEAB (сН 7,5) и экстрагировали хлороформом. Хроматографию на силикагеле и выделение фосфотриэфира защищенного динуклеозид-фосфата (IV) вели, как описано выше. Выход составил 70%. Аналогичным был синтез фосфотриэфира защищенного тринуклеозид-фосфата (VII) с выходом 59%.

В. 0,05 ммоль нуклеотида защищенного олигонуклеотида (III) растворяли в 1 мл смеси пиридин-конц. NH₄OH (1:10) и выдерживали при комнатной температуре 6 сут. Затем раствор упаривали, остаток растворяли в 40 мл 0,01 н. HCl и выдерживали 2 ч при 50°C. Полученный

раствор центрифугировали конц. NH_4OH , экстрагировали серным эфиром и наносили на колонку (2×20 см) с QAE-сефадексом А-25 (HCO_3^- / $(\text{NH}_4\text{HCO}_3, 0-0,6 \text{ M } 2 \text{ л})$). Фракции, соответствующие пику целевого продукта, объединяли, упаривали с добавлением воды и лиофилизировали. Выход ArUpC составил 40%.

Синтез $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ и $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ с участием РНК-лигазы. Концентрации компонентов реакционной смеси: акцептор — 1 мМ, донор — 1 мМ, АТФ — 2 мМ, трис- HCl буфер ($\text{pH } 8,7$) — 0,05 М, MgCl_2 — 10 мМ, дитиотреитол — 10 мМ, альбумин — 0,2 мг·мл⁻¹, глицерин — 12,5% (по объему).

Синтез $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$, исходя из ArUpG и $(\text{pU})_6$, вели при 30 °С в объеме 2–10 мл при концентрации РНК-лигазы — 1,2–0,25 мкМ. Время реакции — 12–24 ч.

$\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ синтезировали при 20 °С в объеме 0,1–1,75 мл при концентрации РНК-лигазы — 3 мкМ. Акцептор — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$, донор — $(\text{pA})_5\text{pAr}$ или $(\text{pA})_6\text{pA}^{\text{ox}}$. Время реакции — 48 ч.

За ходом реакции следили, анализируя отобранные через определенные промежутки времени пробы (1 мкл), методом обращенно-фазовой МКХ [12]. Перед МКХ пробы разбавляли в 20 раз водой и програвляли 2 мин при 100 °С.

По достижении плато реакционную смесь в случае синтеза $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ разбавляли в 3 раза водой, прогревали 5 мин при 100 °С и хроматографировали на QAE-сефадексе А-25 в HCO_3^- -форме. Элюцию вели со скоростью 40 мл/ч раствором бикарбоната аммония в 15%-ном диоксане (линейный градиент концентрации от 0,4 до 0,8 М). Фракции, содержащие $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$, объединяли, упаривали несколько раз с добавлением воды для удаления NH_4HCO_3 , после чего лиофилизировали.

Пентадскарбонуклосид $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ выделяли обращенно-фазовой хроматографией на синтезированном нами сорбенте [12], используя линейный градиент концентрации раствора KCl (0,05–0,5 М) в 0,01 М имидзоль- HCl буфере ($\text{pH } 7,0$) с 9 М мочевиной. Целевой продукт собирали, переносили в целлофановый диализный мешок и обессоливали диализом, после чего лиофилизировали.

В случае использования в качестве донора $(\text{pU})_6\text{pA}^{\text{ox}}$ перед хроматографией к реакционной смеси добавляли 4-кратный объем 0,3 М раствора анилина в 0,01 М свежеприготовленном ацетатном буфере ($\text{pH } 5,5$) и выдерживали 3 ч при 40 °С.

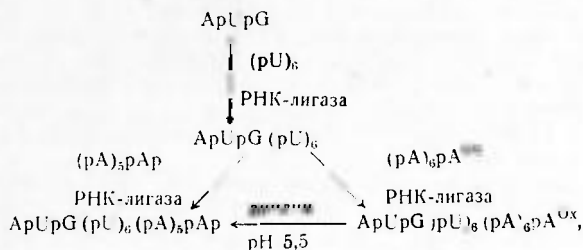
Доказательство строения полученных олигорибонуклеотидов. ArUpG . Продукт гомогенен при обращенно-фазовой хроматографии на Nucleosil C-18. Гидролиз смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклотидазы из яда кобры в 0,02 М трис- HCl , содержащем 2,5 мМ MgCl_2 , ($\text{pH } 7,8$) при 20 °С в течение 16 ч с последующим анализом МКХ на Nucleosil C-18 дал соотношение $\text{A}:\text{U}:\text{C}=1,1:1,2$. Гидролиз РНКазой T_2 в 0,01 М CH_3COON , содержащем 0,4 мМ EDTA ($\text{pH } 4,5$), при 20 °С в течение 12 ч с последующей МКХ на Nucleosil C-18 дал соотношение $\text{Ar}:\text{Up}:\text{C}=1:1,1:1,1$.

$\text{ArUpG}(\text{pU})_6$. Продукт гомогенен при МКХ на DEAE-целлюлозе DE-52 в системе Томлинсона — Тенера. Строение его подтверждали гидролизом РНКазой T_1 . Реакцию проводили в объеме 20 мкл. Концентрации компонентов: $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ — 0,06 мМ, трис- HCl буфер ($\text{pH } 8,5$) — 0,05 М, MgCl_2 — 2,5 мМ, РНКазы T_1 — 0,2 мг/мл. Время реакции — 20 мин при 37 °С. По окончании реакции отбирали аликвоту 5 мкл для анализа, а к оставшейся реакционной смеси добавляли 0,5 мкг фосфомоноэстеразы из *E. coli* и инкубировали еще 3 ч при 37 °С. Гидролизаты анализировали методом МКХ в системе Томлинсона — Тенера на DE-52.

ArUpG(pU)₆(pA)₅pAr и ArUpG(pU)₆(pA)₁₀pA(p). Выделенные олигонуклеотиды были гомогенны по данным МКХ на новом обращенно-фазовом сорбенте [12] и на аминокроме.

Для определения нуклеотидной последовательности к олигонуклеотидам, обработанным фосфоноэстеразой из *E. coli*, присоединяли 5'—[³²P]pCp с помощью РНК-лигазы и проводили прямое химическое секвенирование по методу Плитт [22]. После разделения образующегося набора фрагментов электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле (толщина слоя 0,5 мм, длительность — 60 мин, 3000 В), получили автордиограмму, приведенную на рис. 4.

Обсуждение. Для изучения процессов функционирования рибосом мы предприняли химико-ферментативный синтез двух олигорибонуклеотидов, содержащих кодон инициации на 5'-конце молекулы:



где A^{ox} — диальдегидаденозин.

Акцептор фосфата ArUpG для первой РНК-лигазной реакции был получен двумя вариантами фосфотриэфирного метода I, II. В обоих случаях синтез вели в 3'-направлении постадийным присоединением защищенных нуклеозидов. Вариант I основан на взаимодействии 3'-фосфодиэфира (II или V), полученного с помощью *n*-хлорфенилфосфодиэфиризолида, с защищенным нуклеозидом в присутствии мезитиленилсульфотриэфиризолида как конденсирующего агента [7, 8, 21]. По варианту II синтез вели без конденсирующих агентов, используя *n*-хлорфенилфосфотриэфиризолид как бифункциональный фосфорилирующий агент и DMAP как нуклеофильный катализатор [8, 9]. В рибо-ряду такая комбинация реагентов была использована ранее для синтеза A-(2'—5')-A-(2'—5')A [17]. Несмотря на необходимость проведения реакции в строго безводных условиях, вариант II кажется нам предпочтительным для синтеза коротких олигонуклеотидов. Реакция идет быстро, не требует применения конденсирующих агентов и, следовательно, исключает как необходимость их синтеза, так и возможность образования побочных продуктов под действием этих агентов.

Защищенное фосфотриэфирное производное ArUpG (VII) подвергли последовательно обработке NH₄OH и 0,01 н. HCl для снятия защитных групп, и ArUpG выделяли ионообменной хроматографией.

Гомогенность ArUpG проверяли обращенно-фазовой МКХ на Nucleosil C-18. Нуклеотидный состав его доказывали гидролизом смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры, а отсутствие примесей олигонуклеотида с неестественной межнауклеотидной связью подтверждали количественным гидролизом его РНКазой T₂.

Донор фосфата в первой РНК-лигазной реакции представлял собой гексарибуридинловую кислоту (pU)₆, полученную гидролизом поли-(U)-нуклеазой из яда кобры [4]. Синтез ArUpG(pU)₆ вели при температуре 30°C, являющейся при pH 8,7 неоптимальной для самоконденсации (pU)₆ [6, 21]. Как видно из рис. 1, целевой продукт (пик 5) является основным продуктом реакции, несмотря на то, что при соотноше-

нии донор — акцептор 1 : 1, донор не был блокирован по 3'-концу. Синтезированный нонарибонуклеотид был выделен хроматографией на QAE-сефадексе А-25. Выход его после очистки, обессоливания и лиофилизации составлял 25—30%. Степень превращения для ArUpG и $(\text{pU})_6$ (рис. 1) равна соответственно 47 и 83%. Выделенный $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ был хроматографически гомогенен (рис. 2), а сравнение хроматографи-

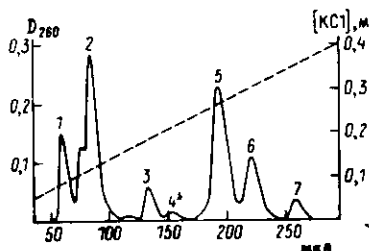


Рис. 1. Микроколоночная обращенно-фазовая хроматография аликвоты реакционной смеси, отобранной через 12 ч от начала реакции при синтезе нонарибонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$.

Пики: 1 — AMP, 2 — АТР, ArUpG , 3 — $(\text{pU})_6$, 4 — $\text{A}(5')\text{ppU}(\text{pU})_6$, 5 — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$, 6 — цикло- $(\text{pU})_6$, 7 — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$. Пики 1, 2 и 3 идентифицированы по соответствующим маркерам; пик 4 — по включению радиоактивной метки при добавлении в реакционную смесь $[8-^3\text{H}]$ АТР; пик 6 — по устойчивости к фосфодиэстеразе из ядра кобры; структура пиков 5 и 7 подтверждена гидролизом рибонуклеазой T_1 с последующей идентификацией продуктов реакции.

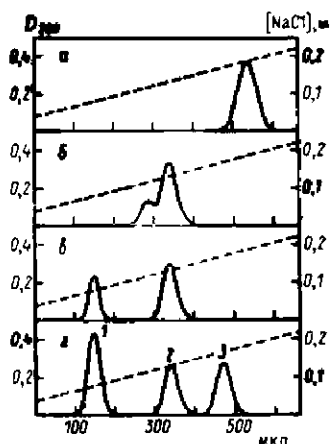


Рис. 2. Микроколоночная хроматография нонарибонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ (а), продуктов гидролиза его рибонуклеазой T_1 (б), рибонуклеазой T_1 и фосфоноэстеразой из *E. coli* (в), и смеси маркеров (г) на DEAE — целлюлозе.

Пики: 1 — ArUpG , 2 — $(\text{pU})_6$, 3 — $(\text{pU})_6$.

ческой подвижности продуктов гидролиза данного олигорибонуклеотида РНКазой T_1 (рис. 2, б) и последовательного гидролиза РНКазой T_1 и фосфоноэстеразой (рис. 2, в) с маркерами (рис. 2, г) однозначно подтверждает его строение. Всего, таким образом, было получено 800 OE_{260} нонарибонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$.

Донор фосфата во второй РНК-лигазной реакции — гексарибоадениловая кислота — был блокирован по 3'-концу. В данной работе были использованы два варианта защиты: 3'-фосфат [см. напр. 11] и модифицированный периодатным окислением остаток 5-AMP- pA^{ox} [20]. Оба типа блокированных по 3'-концу доноров получали известным методом [10] из терминированной 5'-фосфатом гептарибоадениловой кислоты путем окисления диэдиольной группы ее 3'-концевого аденозина периодатом натрия (донор $(\text{pA})_6\text{pA}^{\text{ox}}$) или путем последовательной обработки $(\text{pH})_7$ периодатом натрия и анилином (донор $(\text{pA})_6\text{pAr}$). После соответствующей очистки защищенные по 3'-концу доноры были «сшиты» РНК-лигазой с акцептором $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ при соотношении донор : акцептор 1 : 1. Реакцию вели при температуре 20°C, оптимальной для

уридинловых акцепторов. Как видно из рис. 3, pA^{OX} оказался лучшей защитной группой: при его использовании образуется меньше побочных продуктов, чем при использовании 3'-фосфата. Поэтому для препаративного синтеза $ArUpG(pU)_6(pA)_5$ pAr мы выбрали донор $(pA)_6pA^{OX}$. Выход пентадекарбионуклеотида после удаления 3'-концевого диальдегидальдезида с помощью катализируемой анилином pA^{OX} реакции обращения-фазовой хроматографии на синтезированном нами сорбенте [12], обессоливания и лиофилизации составил 18—20% (степень превращения для донора и акцептора составила соответственно 82 и 90%, рис. 3, б). Всего было получено 105 ОЕ₂₆₀ $ArUpG(pU)_6(pA)_5pAr$.

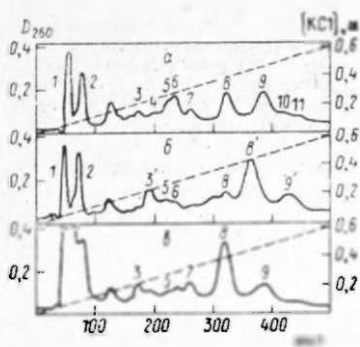


Рис. 3. Микроколоночная хроматография эликтов реакционных смесей, отобранных через 48 ч от начала реакции, при синтезе пентадекарибонуклеотида $\text{ArUpG(pU)}_6(\text{pA})_5\text{rAr}$.

Рис. 4. Радиоавтограмма полноразмерного геля при определении первичной структуры $\text{ArUpG}(\text{rU})_6(\text{rA})_5\text{rAr}$ (а) и $\text{ArUpG}(\text{rU})_6(\text{rA})_{17}\text{rAr}(\text{r})$ (б) по методу Питти [17]. (Анализ выполнен А. С. Мамыкиным, МГУ).

Как видно из рис. 3, наряду с ожидаемым пентадекарибонуклеотидом при реакции образуется несколько побочных продуктов, в том числе и большей длины. Один из этих продуктов (пик 9) был выделен аналогично пентадекамеру в хроматографически однородном виде. Первоначально полученным нами данным этот олигонуклеотид соответствовал продукту двукратного присоединения донора $(pA)_2pAp$ к акцептору $ApUpG(pU)_6$. Но при установлении его структуры по методу Питти [22] (рис. 4) было показано, что это $ApUpG(pU)_6(pA)_{10}pA(p)$ (наличие 3'-фосфата точно не установлено). Это согласуется с данными Уленбека [19] о том, что РНК-лигаза иногда проявляет способность удалять 3'-концевой нуклеозид-3',5'-дифосфат.

Таким образом, препаративный химико-ферментативный синтез олигорибонуклеотидов, содержащих инициирующий кодон $ApUpG$ на 5-конце, может служить моделями информационной РНК при изучении процессов биосинтеза белка.

* Авторы глубоко признательны академику Д. Г. Кнорре за постоянный интерес к работе и ее поддержку, а также А. С. Манькину (МГУ), установившему структуры олигорибонуклеотидов.

Summary

Oligoribonucleotides $ApUpG(pU)_6(I)$ and $ApUpG(pU)_6(pA)_2pAp(II)$ bearing the initiating codon at their 5'-terminus were synthesized. (I) and (II) were prepared by using of RNA ligase. $ApUpG$ was elongated stepwise in the 3'-direction by adding of $(pU)_6$ and then $(pA)_2$ blocked at its 3'-end with phosphate or dialdehydeadenosine. $ApUpG$ was obtained chemically by two variants of the triester approach. The RNA ligase catalysed synthesis of (I) was carried out in the conditions optimal for "good" acceptors (30°C, 24 h, pH 8.7). In spite of equimolar ratio of $ApUpG(pU)_6$ and the absence of 3'-protection of the donor the yield was 25–30% after subsequent purification.

The synthesis of (II) was carried out in the conditions optimal for "poor" acceptors (20°C, 48 h, pH 8.7). The yield was 18–20% after aniline catalyzed β -elimination of the dialdehydeadenosine from the 3'-end and subsequent purification. In this reaction $ApUpG(pU)_6(pA)_{10}pA(p)$ was observed in addition to the expected (II).

The sequencing of oligoribonucleotides was carried out according to Peattie.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Берзинь В. А. и др. Исследование мРНК-связывающей области рибосомы на разных этапах трансляции. I. Функциональная активность аналогов мРНК-AUGU₆ и его бензильденовых производных - в рибосомнозависимом белковом синтезе. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1535–1543.
2. Василенко С. К., Обухова Л. В., Ямковой В. И. Получение полигидразидных производных полиакриламидных гелей и их использование для фракционирования тРНК. — Биохимия, 1971, т. 36, вып. 6, с. 1288–1293.
3. Василенко С. К., Райт В. К. Метод выделения высокоочищенной рибонуклеазы из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. Биохимия, 1975, т. 40, вып. 3, с. 578–583.
4. Василенко С. К., Сербо Н. А., Веняминава А. Г. и др. Препаративное получение 5-олигорибонуклеотидов с помощью рибонуклеазы из яда кобры. Биохимия, 1976, т. 41, вып. 2, с. 260–263.
5. Василенко С. К., Веняминава А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. И. РНК-лигаза бактериофага T4.1. Очистка, тестирование, димерная форма. — Биорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 621–627.
6. Веняминава А. Г., Корочкина С. Е., Франк Л. А., Ямковой В. И. Исследование кинетики РНК-лигазной реакции при разных температурах. — В кн.: Тезисы докладов на III Всесоюзной конференции по методам получения и анализа биохимических препаратов, г. Олайне Латв. ССР, 1979, с. 58–59.
7. Веняминава А. Г., Франк Л. А., Ямковой В. И. РНК — лигаза бактериофага T4.111. Синтез полирибонуклеотида, содержащего кодон инициации на 5'-конце молекулы. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 98–102.
8. Веняминава А. Г., Овчаренко Г. В., Реткова М. Н., Франк Л. А. Синтез кодонов лейцина и их использование для изучения кодового соответствия тРНК^{Leu}. — Молекул. биология, 1984, т. 18, № 5, с. 9.
9. Веняминава А. Г., Реткова М. Н., Франк Л. А. Синтез олигорибонуклеотидов без конденсирующих агентов. — Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1984. Сер. хим. н., вып. 3, № 8, с. 105.

10. Френкель-Конрат Г., Стайниайдер А. Ступенчатая деградация РНК: керио-
латное окисление и последующее отщепление концевго звена амплином. В кн: Ме-
тоды исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 105—107.
11. Юодка Б., Уленбек О. Олигонуклеотиды и нуклеотидопептиды XXIII. При-
родные Т4 РНК-лигазы для сшивания олигорибонуклеотидов. — Биоорган. химия
1976, т. 2, № 7, с. 898—902.
12. Яковлев В. Н. Хроматографический носитель для фракционирования олиго-
нуклеотидов. А. с. № 685975 (СССР). — Бюл. изобр., 1979, № 34.
13. Яковлев В. Н. РНК-лигаза бактериофага Т4. 11. Оптимальные температур-
ные условия реакции образования олигонуклеотидной связи при «сшивании» олиго-
рибонуклеотидов. — Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1808—1818.
14. Яковлев В. Н., Веняминаева А. Г., Василенко С. К. и др. Способ получения
РНК-лигазы. А. с. № 910762 (СССР). — Бюл. изобр. № 9, 1982.
15. Ganoza M. C., Fraser A. R., Neilson T. Nucleotides contiguous to AUG affect
translational initiation. — Biochemistry, 1978, vol. 17, N 14, p. 2769—2775.
16. Ganoza M. C., Sullivan P., Cunningham Ch., Hader P., Kojoid E. C., Neil-
son T. Effect of bases contiguous to AUG on translation initiation. — J. Biol. Chem.,
1982, vol. 257, N 14, p. 8228—8232.
17. Karpeisky M. Ya., Beigelman L. N., Michailov S. N., Padyukova N. Sh.,
Surt J. Synthesis of adenylyl(2'—5')-adenylyl(2'—5')-adenosine. — Collect. Czech. Chem.
Commun., 1982, vol. 47, N 1, p. 156—166.
18. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. The use of arylsulfonfyltriazoles for
the synthesis of oligonucleotides by the triester approach. — J. Amer. Chem. Soc., 1975,
vol. 97, N 25, p. 7332—7337.
19. Krug M., Uhlenbeck O. C. Reversal of T4 RNA ligase. — Biochemistry, 1982,
vol. 21, N 8, p. 1288—1293.
20. Kaufmann G., Kallenbach N. R. Determination of recognition sites of T4 RNA
ligase on the 3'-OH and 5'-P-termini of polyribonucleotide chains. — Nature, 1975,
vol. 254, N 5499, p. 452—454.
21. Ohtsuka E., Yamane A., Ikehara M. Studies on transfer ribonucleic acids and
related compounds. XLIII. Synthesis of oligoribonucleotides by using 5'-selective
phosphorylation of 2'-O-tetrahydrofuranlyl nucleosides. — Chem. Pharm. Bull., 1983,
vol. 31, N 5, p. 1534—1543.
22. Peattie D. Direct chemical method for sequencing RNA. — Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 1979, vol. 76, N 4, p. 1760—1764.